



中 华 人 民 共 和 国 医 药 行 业 标 准

YY/T 0616.7—XXXX

一次性使用医用手套 第 7 部分：抗原性蛋白质免疫学测定方法

Medical gloves for single use-Part 7: Test method for the immunological measurement of antigenic protein

2019. 7. 11

（征求意见稿）

在提交反馈意见时，请将你所知道的相关专利连同支持性文件一并附上。

XXXX – XX – XX 发布

XXXX – XX – XX 实施

前 言

YY/T 0616 的总标题为《一次性使用医用手套》，由以下部分组成：

- 第 1 部分：生物学评价要求与试验；
- 第 2 部分：测定货架寿命的要求和试验；
- 第 3 部分：用仓贮中的成品手套确定实际时间失效日期的方法；
- 第 4 部分：抗穿刺试验方法；
- 第 5 部分：抗化学品渗透 持续接触试验方法；
- 第 6 部分：抗化疗药穿透试验方法；
- 第 7 部分：抗原性蛋白质免疫学测定方法。

.....

本部分为YY/T 0616的第7部分。

本部分按照GB/T 1.1-2009给出的规则起草。

请注意本文件的某些内容可能涉及专利。本文件的发布机构不承担识别这些专利的责任。

本部分由国家药品监督管理局提出。

本部分由山东省医疗器械产品质量检验中心归口。

本部分起草单位：。

本部分主要起草人：。

引 言

医护人员在工作中可能会接触到一些对健康人群产生危害的化学品，为避免此类危害，医护人员需要佩戴具备相应防护性能的产品（如医用手套），以达到有效防护的目的。医用手套按原料材质的不同通常分为天然橡胶胶乳手套与合成橡胶手套两大类。天然橡胶胶乳手套中含有天然橡胶胶乳蛋白，能诱发I型超敏反应，表现为皮肤局部荨麻疹，过敏性鼻炎、哮喘和极少过敏等症状。在天然橡胶来源的产品中存在多种能够引发（I型）过敏反应的蛋白。由于天然橡胶胶乳手套中化学添加剂的干扰，使用标准蛋白比色法对天然橡胶产品中的蛋白水平进行定量可能产生假阳性结果。此外，产品中天然橡胶胶乳（natural rubber latex, NRL）蛋白含量常常低于标准比色蛋白分析的检测限度。

YY/T 0616的本部分并不旨在解决与使用有关的所有安全问题。本部分的使用者有责任建立适当的安全和健康做法，并在使用前确定其适用性。

一次性使用医用手套 第 7 部分：抗原性蛋白质免疫学测定方法

1 范围

本部分规定了一次性使用医用手套中胶乳蛋白质含量的测定方法,适用于一次性使用医用天然橡胶胶乳手套中抗原性蛋白质的评价。

2 规范性引用文件

下列文件对于本文件的应用是必不可少的。凡是注日期的引用文件,仅注日期的版本适用于本文件。凡是不注日期的引用文件,其最新版本(包括所有的修改单)适用于本文件。

GB/T 16886.1 医疗器械生物学评价 第1部分:风险管理过程中的评价与试验

GB/T 16886.20 医疗器械生物学评价 第20部分:医疗器械免疫毒理学试验原则和方法

3 术语和定义

GB/T 16886.1、GB/T 16886.20界定的以及下列术语和定义适用于本文件。

3.1

抗体antibody

即免疫球蛋白,是作为免疫应答的一部分产生的蛋白,能够与抗原特异性结合。

3.2

抗原antigen

能引起机体产生免疫反应的物质。

3.3

一抗primary antibody

在反应体系中最先使用的与抗原特异性结合的抗体。

3.4

二抗secondary antibody

在反应体系中与一抗重链特异性结合的酶结合抗体。

3.5

封闭液blocking solution

用于防止非特异性抗体反应的非反应性蛋白溶液。

3.6

浓度范围concentration range

推荐的分析物浓度范围，以 $\mu\text{g/mL}$ 作为单位，具有0.1至2.0单位的吸光度读数。

3.7**偏差deviation**

平均测定值与参考值（真值）之间的差异。

4 缩略语

下列缩略语适用于本文件。

ELISA：酶联免疫吸附试验

HRP：辣根过氧化物酶

IRM：工业标准物质

NRL：natural rubber latex，天然橡胶胶乳

OPD：邻苯二胺

PBS：磷酸盐缓冲液

StAg：抗原标准品

T-PBS：吐温磷酸盐缓冲液

TMB：3,3',5,5'-四甲基联苯胺

5 实验原理

本部分是采用天然橡胶胶乳（NRL）蛋白特异性抗体测定天然橡胶胶乳手套中抗原蛋白含量的免疫学方法。本方法通过抑制ELISA法定量测定溶液中胶乳蛋白抗原。胶乳蛋白抗原被吸附固定于96孔测定板的板孔内。在稀释板中，样品浸提液与NRL蛋白特异性抗体混合。抗体与相关NRL抗原孵育结合后，将混合物加入含有固相抗原的测定板中。未与样品浸提液中NRL蛋白结合的抗NRL抗体将与板中的固相抗原结合。洗去可溶性抗原抗体复合物，加入二抗（即酶标记抗体），使其与固相上NRL蛋白所结合的一抗特异性结合。通过底物显色反应导致颜色变化。本方法对NRL蛋白的检测范围在 ng/mL 的范围。

6 仪器

天平；离心机（可离心 $1000\times g$ ）和相应离心管；恒温箱；分光光度计（用于96孔微量测定板读数，并可选计算机进行数据分析）。

7 试剂和耗材**7.1 试剂****7.1.1 缓冲液****7.1.1.1 碳酸盐缓冲液(pH 9.6)**

用天平称量并将0.795 g碳酸钠(Na_2CO_3)、1.465 g碳酸氢钠(NaHCO_3)、0.1 g叠氮化钠(NaN_3)溶于蒸馏水中，定容至500 mL。检查pH值并在必要时进行调整。

注：碳酸盐缓冲液可在 $(4\pm 3)^{\circ}\text{C}$ 储存至少1个月。亦可采用市售碳酸盐缓冲液。

7.1.1.2 磷酸盐缓冲液(PBS, pH 7.4, $10\times$ 贮存液)

用天平称量5.125 g磷酸二氢钠($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$)、45g磷酸一氢钠($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)并溶于1.5 L蒸馏水中,并调整pH值至7.4。加入175.3 g氯化钠(NaCl),用蒸馏水定容至2L。使用前取适宜体积的 $10\times$ 贮存液用蒸馏水按照1:10 (v/v)稀释为 $1\times$ PBS。

注：亦可采用市售磷酸盐缓冲液。

7.1.1.3 T-PBS 洗液

在1 L的 $1\times$ PBS中加入0.5mL吐温20(Tween 20),混匀。

7.1.2 封闭液和抗体稀释液

7.1.2.1 封闭液

含3 %脱脂奶粉(w/v)的T-PBS, 100 mL (用于测定板和稀释板的封闭处理)。

7.1.2.2 稀释液

含0.2 %脱脂奶粉(w/v)的T-PBS, 100 mL (用于抗体稀释和竞争抑制步骤中的封闭)。

7.1.3 参考品试剂

7.1.3.1 StAg 溶液

用蒸馏水制备的浓度为1mg/mL的NRL蛋白溶液。聚丙烯管分装储存于 $(-20\pm 10)^{\circ}\text{C}$,解冻后储存于 $(4\pm 3)^{\circ}\text{C}$ 。

注：市售StAg标准品溶液可选IRM-913。

7.1.3.2 包被抗原

用碳酸盐缓冲液将StAg溶液配制成浓度为 $3\mu\text{g/mL}$ 的溶液,用于包被测定板。

7.1.3.3 参考标准品

用稀释液将StAg溶液配制成浓度为 $2\mu\text{g/mL}$ 的溶液,用于竞争抑制。

注：为了减少可能的蛋白质损失,所有涉及含蛋白质溶液的步骤必须在聚丙烯管或容器中进行。避免使用聚苯乙烯或玻璃容器。

7.1.4 抗体

7.1.4.1 一抗

可采用市售抗NRL抗体,市售抗NRL抗体可选IRM-914。

7.1.4.2 二抗

辣根过氧化物酶(HRP)结合的抗兔IgG,用于检测固相上NRL蛋白结合一抗。推荐用稀释液1:5稀释并分装储存于 $(-20\pm 10)^{\circ}\text{C}$ 。

7.1.5 底物显色溶液

可将邻苯二胺(OPD)和过氧化氢用于黄色显色反应。将市售OPD片剂溶解于蒸馏水中,并按照操作说明加入适量的过氧化氢(H_2O_2)。如将10mg OPD片剂溶解于10mL蒸馏水中,并在使用前加入 $30\ \mu\text{L}\ \text{H}_2\text{O}_2$ (30%)。

注:亦可采用TMB试剂盒显色。

7.2 耗材

96孔微量测定板;稀释板,低蛋白结合的96孔板用于样品稀释和抗体反应;多通道移液器;ELISA板密封带或塑料盖子。

8 天然橡胶胶乳及其制品中抗原蛋白免疫学测定

8.1 样品制备

8.1.1 宜使用 pH 7.4 的水性缓冲液作为浸提介质,推荐采用无机盐缓冲盐液。

8.1.2 对天然橡胶胶乳手套称重,并记录重量及表面积;每克天然橡胶胶乳手套宜加入 5mL 的浸提介质。浸提温度为 $(25\pm 5)\ ^\circ\text{C}$;浸提时间为 $(120\pm 5)\ \text{min}$ 。浸提过程应持续搅动,以确保样品与浸提介质充分接触。或在浸提过程的开始、中间和结束阶段分别振荡三次,间隔 15 s/次。

8.1.3 取出浸提液至聚丙烯管中,置入离心机内离心($\geq 500\times g$), 15 min,弃去颗粒等沉淀;或通过低蛋白结合的 $0.45\ \mu\text{m}$ 滤器过滤收集浸提液至聚丙烯管中。

注1:在聚丙烯容器中进行浸提,以减少由于吸附到容器壁内表面而损失蛋白质的可能。

注2:对于含有颗粒的有粉天然橡胶胶乳手套,可参照附录 A 中含颗粒产品的橡胶检测校正方法处理。

注3:一般可立即使用所得浸提液,但可在 $(4\pm 3)\ ^\circ\text{C}$ 下储存至多两天。

8.2 试验步骤

8.2.1 稀释板的封闭:

向96孔稀释板每孔加入 $300\ \mu\text{L}$ 封闭液, $(4\pm 3)\ ^\circ\text{C}$ 孵育过夜。

8.2.2 测定板的包被

向96孔测定板每孔加入 $100\ \mu\text{L}$ 包被抗原(StAg, $3\ \mu\text{g}/\text{mL}$),用ELISA板密封带或塑料盖子封板, $(37\pm 1)\ ^\circ\text{C}$ 孵育 $(120\pm 5)\ \text{min}$ 。用T-PBS洗板一次,弃去上清。或在 $(4\pm 3)\ ^\circ\text{C}$ 包被抗原过夜,并在后续试验开始前T-PBS洗板一次。每孔加入 $300\ \mu\text{L}$ 封闭液并封板, $(37\pm 1)\ ^\circ\text{C}$ 于恒温箱内孵育1 h。

8.2.3 抑制步骤

8.2.3.1 在96孔稀释板中,用T-PBS洗板2次;如表1所示,除A行外,每孔加入 $100\ \mu\text{L}$ 稀释缓冲液;向A行中A1和A2孔各加入 $200\ \mu\text{L}$ 抗原标准品(StAg, $2\ \mu\text{g}/\text{mL}$),向A3至A12孔各加入 $200\ \mu\text{L}$ 待测样品(每个样品至少2复孔);通过从A行取 $100\ \mu\text{L}/\text{孔}$ 至B行各孔,再从B行依次至G行,将抗原标准品或待测样品进行7个系列梯度稀释(每次通过上下吸液5次来混匀,最后在G行混匀后弃去 $100\ \mu\text{L}/\text{孔}$);H行为无抑制行,其各孔含 $100\ \mu\text{L}$ 稀释液。

注:每个待测样品具有3个稀释倍数(至少具有2个稀释倍数),且每一稀释倍数具有2个重复。

8.2.3.2 准备适宜稀释度的一抗，使“无抑制”孔的最大 OD 值为 0.8~2.0。根据表 1 所示，加入一抗 100 μL/孔，无一抗的对照孔则加入 100 μL 稀释液，使最终各孔体积均为 200 μL。封板，(37±1)℃ 孵育 (120±5)min。

表 1 抑制步骤中 96 孔稀释板操作举例

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	StAg 2μg/mL		浸提液 1 1:1		浸提液 2 1:1		浸提液 3 1:1		浸提液 4 1:1		浸提液 5 1:1	
B	StAg 1μg/mL		浸提液 1 1:2		浸提液 2 1:2		浸提液 3 1:2		浸提液 4 1:2		浸提液 5 1:2	
C	StAg 0.5μg/mL		浸提液 1 1:4		浸提液 2 1:4		浸提液 3 1:4		浸提液 4 1:4		浸提液 5 1:4	
D	StAg 0.25μg/mL		浸提液 1 1:8		浸提液 2 1:8		浸提液 3 1:8		浸提液 4 1:8		浸提液 5 1:8	
E	StAg 0.125μg/mL		浸提液 1 1:16		浸提液 2 1:16		浸提液 3 1:16		浸提液 4 1:16		浸提液 5 1:16	
F	StAg 0.063μg/mL		浸提液 1 1:32		浸提液 2 1:32		浸提液 3 1:32		浸提液 4 1:32		浸提液 5 1:32	
G	StAg 0.031μg/mL		浸提液 1 1:64		浸提液 2 1:64		浸提液 3 1:64		浸提液 4 1:64		浸提液 5 1:64	

8.2.4 将样品加至测定板

在 96 孔测定板中，用 T-PBS 洗板 2 次。在加入抑制混合物之前，应确保尽可能弃除测定板中残留液体且该板未干燥。从抑制步骤所用的稀释板中取出 100 μL/孔加至测定板。封板，(37±1)℃ 孵育 (120±5) min。

8.2.5 与二抗（HRP 结合的抗兔 IgG）孵育

在 96 孔测定板中，用 T-PBS 洗板 3 次。除了“无二抗”组加入 100 μL/孔稀释液，其余各孔加入 100 μL 适当稀释的二抗，(37±1)℃ 孵育 (60±5) min。

8.2.6 底物反应与光度计读数

在 96 孔测定板中，用 T-PBS 洗板 3 次。加入 100 μL/孔底物显色液，室温孵育 (5~30) min，注意最终检测的 OD 值不宜超过 2.0。用终止液（如 4 N 硫酸）终止显色反应。宜在加入终止液 5 min 后，用分光光度计在适宜的检测波长下读数。

注：T-PBS 洗液温度可能影响 ELISA 检测并出现“边缘效应”，即板周边孔的 OD 值始终高于或低于内部重复孔。对于这些结果的一个可能的解释是，如果在室温下洗板，然后将其置于较高温度如 37℃ 的孵箱中，则微孔板的冷热不均。可以通过确保洗液的温度与孵育的温度相同，来减少温度分布不均匀的影响。

8.3 结果计算

将标准品的平均吸光度值减去本底吸光度值（无二抗）并与标准品浓度绘制拟合曲线。将待测样品的吸光度值代入标准曲线得出所含 NRL 蛋白浓度范围（μg/mL）。待测样品至少有 2 个稀释度的吸光度值在

试验设置的标准品读数范围内，宜在40%至65%的抑制率之间。或者，将OD值转换为抑制百分比，然后通过校准曲线得出所含NRL蛋白浓度($\mu\text{g/mL}$)。

注 1：由于测试的抗原水平是由测试方法专门定义的，该测试方法不存在参考值，因此不能确定偏差。

注 2：物质如洗涤剂或表面活性剂具有防止抗体与抗原结合的可能，并可能干扰 ELISA 测定。然而，由于 ELISA 检测的敏感性，这些干扰常常可以通过连续稀释样品来控制。

9 试验报告

试验报告中宜至少包含下列信息：

- a) 试验样品名称、规格型号和批号；
- b) 试验样品制备方法；
- c) 试验条件和试验步骤；
- d) 试验结果；
- e) 结论。

附 录 A
(资料性附录)
含颗粒产品的胶乳蛋白检测校正方法

A.1 概述

本附录通过校正方法检测含颗粒手套浸提液中橡胶抗原蛋白水平。这里仅描述需要修改的步骤；所有其他步骤保持不变。

通常，附着在粉末上的蛋白质并非该方法测定的胶乳蛋白。然而，这种情况下的测量必然存在误差，并且与粉末结合的抗原蛋白有可能显著影响最终测量，特别是对于粉末手套。如果手套离心后的浸提液测定的浓度 $\geq 8 \text{ g/dm}^2$ ，建议测定完整的浸提液以确保总蛋白水平低于 10 g/dm^2 。

A.2 样品制备

同8.1。在提取之前避免不必要的操作，以防止手套样品中粉末损失。此外，浸提完成后，将浸提液充分摇晃，以确保粉末均匀分布，并将含有可提取蛋白和粉末的溶液转移至聚丙烯管中。

A.3 试验步骤

在96孔稀释板中，用T-PBS洗板2次；如表1所示，除A行外每孔加入100 μL 稀释缓冲液；向A行中A1和A2孔各加入200 μL 抗原标准品 (StAg, 2 $\mu\text{g/mL}$)，先重悬带粉的样品浸提液再向A3至A12孔各加入200 μL 待测样品（每个样品至少2复孔）；按照8.2.3.1的操作完成其余各孔稀释，并在室温下与一抗振荡孵育2h，500 $\times$ g离心15min（也可室温静置30 min）；小心取出100 μL /孔上清至含StAg包被的检测板中，不要移走任何粉末颗粒。
